Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 43- 56

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1، فروردین -اردیبهشت 1399، ص. 56-43

برهمکنش خاصیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی ریحان (*Ocimum basilicum*)، مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) و دارچین در دوغ

هاجر شهسوار[1]- مرضیه بلندی[2]*- هما بقایی[3]

تاریخ دریافت: 1398/01/30
تاریخ پذیرش: 1398/03/12

چکیده

عصاره‌های گیاهی دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده و می‌توانند به‌عنوان یک طعم‌دهنده، جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی شوند. در این پژوهش اثرهم‌افزایی خاصیت ضدمیکروبی ترکیب عصاره‌های هیدروالکلی سه گیاه ریحان، دارچین و مریم‌گلی بر روی سویه‌های غذایی *اشریشیاکلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط دوغ در طی 4 هفته نگهداری در دمای محیط بررسی شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های مورد آزمایش به‌صورت تکی بین 1/60 تا 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی ترکیب هر سه عصاره بین 0/4 تا 3/12 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین ترکیب هر سه عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی بر علیه هر سه باکتری اثر هم‌افزایی داشت و در تمام حالات ترکیب عصاره‌ها اثرات رقابت‌کنندگی مشاهده نشد. ترکیب هر یک از عصاره‌های فوق‌الذکر با غلظت 0/62 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با یکدیگر، به‌صورت معنی‌داری منجر به کاهش جمعیت میکروبی به ویژه باکتری‌های گرم مثبت شد ($p<0/05$). همچنین پذیرش کلی دوغ حاوی ترکیب هر سه عصاره مورد بررسی قابل قبول ارزیابی شد و حدود 90 درصد شرکت‌کنندگان حاضر به مصرف آن بودند. بنابراین کاربرد همزمان این عصاره‌ها می‌تواند در کنترل مؤثر بیماری‌زاهای مواد غذایی به‌عنوان یک روش مکمل مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدمیکروبی دارچین، ریحان، مریم‌گلی، هم‌افزایی

مقدمه

نگهدارنده ها ترکیباتی هستند که برای جلوگیری از رشد و یا از بین بردن میکروارگانیسم‌های مضر به‌منظور افزایش دوره ماندگاری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعات انجام شده در دنیا اثرات نامطلوب این مواد از جمله سرطان‌زایی، سمیت، ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها، جهش‌زایی، آلرژی و برخی مشکلات دیگر به‌عنوان چالشی در سلامت جوامع تأیید شده است (Heinrich *et al*., 2012). امروزه استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی حاصل از گیاهان دارویی به‌دلیل سازگاری بیشتر با بدن از یکسو و دارا بودن ترکیبات فرار مولد طعم از سوی دیگر در حال افزایش است (Celiktas *et al*., 2007). همچنین خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این افزودنی‌های طبیعی به اثبات رسیده است (Tajkarimi *et al*., 2010). از جمله ویژگی‌های سلامت بخشی دوغ می‌توان به حضور ویتامین‌های گروه B، بهبود جذب کلسیم و قابلیت هضم بیشتر نسبت به شیر اولیه اشاره کرد. عدم رعایت استانداردها در هنگام تولید، نقص زنجیره سرما حین توزیع و نگهداری دوغ زمینه را برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها و به‌دنبال آن کاهش زمان ماندگاری دوغ فراهم می‌کند (Tamime *et al*., 1999). به دلیل امکان آلودگی‌های مختلف در دوغ معمولا از افزودنی‌هایی مانند بنزوات سدیم، سوربات پتاسیم و نیز ناتامایسین استفاده می‌شود. براساس قوانین سازمان غذا و دارو استفاده از هرگونه نگهدارنده در دوغ ممنوع است (ISIRI, 2007). مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) گیاهی چندساله و از تیرهٔ نعناعیان[4] است و رویش‌گاه اصلی آن ایران می‌باشد (Haghjoo *et al*.,2016). این گیاه حاوی تانن‌های گروه کاتشین[5] (سالویا[6] تانن)، فلاونوئیدها[7] (اپی‌ژنین[8]، لوتئولین[9])، اسانس‌های فرار (سینئول[10]، کامفور[11]، آلفا و بتاتوجون[12])، مواد گلیکوزیدی[1]، توکوفرول، اسیدروزمارینیک[2] و

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: M.Bolandi@Damghaniau.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i1.80162

4 *Lamiaceae*
5 Catechin
6 Salvia
7 Flavonoid
8 Apigenin
9 Luteolin
10 Cineol
11 Camphor
12 Thujone

اسیدآسکوربیک می‌باشد (Behradmanesh *et al*.,2013). این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بوده و یک آنتی‌بیوتیک به شمار می‌رود (Shirazi *et al*.,2008).

دارچین (*Cinnamomum zeylanicu*) بومی سریلانکا و از تیره برگ بو[3] است. از مهم‌ترین ترکیبات آن می‌توان به سینام‌آلدئید[4] اشاره کرد که به‌عنوان طعم‌دهنده و عامل بوی دارچین در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله ترکیبات دیگر دارچین می‌توان به ترکیبات فنلی مانند اوژنول[5]، ترکیبات ترپنی مانند لیمونن[6]، لینالول[7]، تانن و کومارین[8] اشاره کرد. اثر ضدباکتریایی دارچین مربوط به سینامیک‌آلدئید می‌باشد. همچنین دارچین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز دارد (Tajkarimi *et al*., 2010). ریحان (*Ocimum basilicum* .L) از خانواده نعناعیان بوده و حاوی ترکیبات متعددی همچون مونوترپن‌ها، تری‌ترپن[9]، سزکویی‌ترپن[10] و فلاونوئید می‌باشد. ریحان دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی است و به‌عنوان یک ضداکسیدان محسوب می‌شود (Valse *et al*., 2014). Zareali و همکاران (2015) بیان کردند که افزودن عصاره گیاهان خوشاریزه و چای کوهی علاوه بر بهبود طعم نمونه‌ها بر ممانعت از رشد کپک و مخمر نمونه‌های دوغ نیز موثر می‌باشد. احمدی و همکاران (2018) در پژوهشی به بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس الئورزین بنه بر *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای، کلویورومایسس مارکسیانوس* و *پنیسیلیوم نوتاتوم* و اثر آن بر ماندگاری دوغ ایرانی پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد که طی مدت زمان نگهداری دوغ، جمعیت میکروبی مورد مطالعه در نمونه‌های تیمار شده با اسانس نسبت به شاهد کاهش یافت. به طوری که اسانس الئورزین بنه می‌تواند برای افزایش ماندگاری دوغ مورد استفاده قرار گیرد. ابوالحسینی و همکاران (2019) نشان دادند که اسانس بنه تازه و رسیده در غلظت‌های بالاتر دارای بالاترین اثر بازدارندگی بر روی رشد *کلایورومایسس مارکسیانوس* در دوغ ایرانی است. از آنجا که مطالعات صورت گرفته بر روی دارچین (Nourizadeh *et al*., 2003)، مریم‌گلی (Sajjadi *et al*., 2006) و ریحان (Kermanshah *et al*., 2009) خواص ضدمیکروبی آنها را تأیید می‌نماید اما در زمینه تأثیر هم‌افزایی[11] خاصیت ضدمیکروبی عصاره گیاهان فوق‌الذکر در محیط دوغ تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است این مطالعه با هدف بررسی اثر هم‌افزایی خاصیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی سه گیاه ریحان، دارچین و مریم گلی روی *اشرشیاکلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در جهت ماندگاری بیشتر دوغ در دمای محیط صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه دوغ

شیر خریداری شده از بازار مصرف، در آزمایشگاه جامع دانشگاه علوم پزشکی شاهرود در شرایط بهداشتی تا 95 درجه سانتی‌گراد جوشانیده شد. پس از سرد شدن و رسیدن به دمای 45 درجه سانتی‌گراد، مایه‌زنی شد. برای مایه‌زنی از ماستی که به روش سنتی و در سه تکرار در شیر مایه‌زنی شده بود، استفاده گردید. سپس شیر مایه‌زده شده، برای مرحله تخمیر در انکوباتور، به مدت 3 ساعت در دمای 45 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور تهیه نمونه‌های دوغ، از 50 درصد ماست به همراه 50 درصد آب استریل شده و 0/85 درصد نمک استفاده شد (Zareali *et al*., 2015).

آماده‌سازی گیاهان و عصاره‌گیری

اندام هوایی گیاهان مورد بررسی پس از خریداری با آسیاب (feller، چین) پودر شد. سپس عصاره‌های دارچین، ریحان و مریم‌گلی به روش خیساندن در مرکز رشد فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شدند. 50 گرم پودر ماده گیاهی در اتانول 95 درصد به میزان 500 میلی‌لیتر و به مدت 48 ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلم آزمایشگاهی بسته شد. سپس از کاغذ صافی معمولی عبور داده شد تا بخش جامد آن جدا شود. مایع بدست آمده در دستگاه سانتریفوژ (Hettich-EBA 8S، آلمان) به مدت 10 دقیقه با دور 2000rpm جداسازی و توسط کاغذ صافی واتمن شماره 1 فیلتر شد. ماده فیلتر شده برای خالص سازی نهایی و حذف حلال‌های موجود توسط دستگاه تبخیرکننده دوار (IKA-Rotary، آلمان) در دمای 55 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه در خلاء آبگیری شد. در ادامه، عصاره‌ها به مدت 12 ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد خشک شده و به صورت پودر درآمده و تا زمان مصرف در ظروف تیره در یخچال نگه‌داری شدند (Mehraban *et al*., 2017).

باکتری‌های مورد بررسی

باکتری‌های مورد آزمایش در این پژوهش، سویه‌های غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *اشرشیاکلای* ATCC 700728 و *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC 5193 به‌صورت آمپول

---

1 Glycoside
2 Rosmarinic acid
3 *Lauraceae*
4 Cinnamaldehyde
5 Eugenol
6 Limonene
7 Linalool
8 Coumarin
9 Triterpenoid
10 Sesquiterpene
11 Synergictic effects

لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

تعیین خاصیت ضدمیکروبی

جهت تعیین خاصیت ضدمیکروبی، پس از انتقال سوش میکروبی مورد نظر به محیط کشت برین هارت اینفیوژن (BHI)[1] و 24 ساعت نگهداری آن در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، برای اثبات خلوص کلونی در محیط آگار خون‌دار[2] کشت داده شد. سوش مخمر نیز به محیط کشت سابرو دکستروز براث انتقال داده شد و سپس برای تعیین خلوص کلونی آن از محیط کشت سابرو دکستروز آگار استفاده شد (Abolhosseini *et al.*, 2019).

تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، میکروارگانیسم‌ها در شرایط استریل به محیط مولر هینتون براث (MHB)[3] انتقال یافته و مجدد به مدت 24 ساعت در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. میزان کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌ها از طریق جذب نوری با طول موج 625 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Nova (England Biotech) و با استفاده از لوله استاندارد 0/5 مک فارلند ($1/5\times 10^8$ CFU/ml) قرائت شد. در مرحله بعد رقیق‌سازی میکروب‌ها 1 به 100 انجام شد ($1/5\times 10^6$ CFU/ml) (ISIRI, 2007).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[4] به روش میکرودایلوشن

در این مرحله، از روش رقیق‌سازی بر اساس توصیه NCCLS[5] (2000) ستفاده شد. بدین ترتیب که رقت‌های $\frac{1}{2}$، $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{8}$، $\frac{1}{16}$، $\frac{1}{32}$، $\frac{1}{64}$، $\frac{1}{128}$، $\frac{1}{256}$، $\frac{1}{512}$ و $\frac{1}{1024}$ از عصاره‌ها تهیه شد تا غلظت‌های 25، 12/5، 6/25، 3/12، 1/60، 0/8، 0/4، 0/2، 0/1، و 0/05 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های هیدروالکلی سه گیاه مورد بررسی تهیه شد. برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های میکروتیتر 96 چاهکی استریل (اکستراژن، آمریکا) استفاده شد. ابتدا در هر چاهک 50 میکرولیتر از محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار و50 میکرولیتر از ترکیب سه عصاره با غلظت 0/093 میکرون (مریم گلی با غلظت 0/031 میکرون، ریحان با غلظت 0/031 میکرون و دارچین با غلظت 0/031 میکرون) در انتها 50 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی ($1/5\times 10^6$ CFU/ml) ریخته شد (در مجموع 150 میکرولیتر در هر چاهک). نمونه کنترل مثبت چاهک شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی و نمونه کنترل منفی محیط کشت و عصاره در نظر گرفته شد. پلیت‌های میکروتیتر به مدت30 ثانیه با دور 250 rpm برای مخلوط شدن در شیکر قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. بعد از طی زمان ذکر شده، به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، چاهک‌ها از نظر وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که مانع رشد میکروارگانیسم یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل بود، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی به‌صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها به‌صورت ترکیبی، سریال‌های مختلف به‌صورت $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{2}$ تهیه شد. سپس حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی عصاره‌ها با روش چشمی مشاهده کدورت تعیین گردید.

تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC)[6]

حداقل غلظت کشندگی بر اساس نتایج MIC تعیین شد. مقدار 50 میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد میکروارگانیسم ها در آن متوقف شده بر روی محیط کشت مولر هیلتون آگار (MHA)[7] استریل شده، کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ 99/9 درصد از باکتری‌های زنده اولیه بودند به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها در نظر گرفته شد (Baron & Finegold, 1990).

تعیین اثرات ضدمیکروبی

9 سی‌سی از دوغ آماده شده داخل هر لوله آزمایش ریخته شد. سپس 1 سی‌سی از هر عصاره و 1 سی‌سی از سوسپانسیون ($1/5\times 10^8$ CFU/ml) میکروب نیز به آن اضافه شد. یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت (باکتری+ دوغ)، یک لوله کنترل منفی (عصاره+ دوغ) و یک لوله شاهد (دوغ تنها) درنظر گرفته شد. سپس لوله‌ها در دمای محیط قرار داده شد و در روزهای 7، 14، 21 و 30 از هر لوله به میزان 20 میکرولیتر از باکتری‌ها به روی محیط کشت مولر هینتون آگار و به همین مقدار از مخمر بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. پس از نگه‌داری در انکوباتور به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد ، تعداد کلونی‌ها شمارش شد.

1 Brain Heart Infusion
2 Blood agar
3 Mueller Hinton Broth
4 Minimum Inhibitory Concentration
5The National Committee for Clinical Laboratory Standards
6 Minimum Bactericidal Concentration
7 Mueller Hinton Agar

تعیین برهمکنش فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

برهمکنش فعالیت ضدمیکروبی ترکیب عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی براساس شاخص غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش متقابل ترکیب عصاره این سه گیاه با استفاده از رابطه ذیل محاسبه گردید.

(1)......... (MIC ماده مورد نظر به تنهایی) ÷ (MICماده مورد نظر در حالت ترکیب) = FIC ماده ضدمیکروبی مورد نظر

FIC C = (MIC (A+B+C)/ MIC A) + (MIC (B +A +C)/ MIC B) + (MIC (C+B+A)/ MIC C) + FIC B + FIC A = FIC

(2)

A: عصاره ریحان، B: عصاره دارچین، C: عصاره مریم‌گلی

بررسی تغییرات اسیدیته و pH

pH نمونه‌های مورد نظر توسط دستگاه pHمتر (HANNA، ایتالیا، 211) و اسیدیته برحسب اسیدلاکتیک محاسبه گردید (ISIRI, 1999).

آزمون حسی

در آزمون حسی، از 84 نفر ارزیاب در محدوده سنی 17 تا 65 سال استفاده شد. ابتدا پودر عصاره‌های گیاهی با اتوکلاو استریل گردید. سپس به مقدار 1 سی‌سی از ترکیب سه عصاره مورد نظر در 1000 سی‌سی دوغ به خوبی حل شده و برای تست در اختیار مصرف کنندگان قرار داده شد. از بین موارد مختلف حسی، برخی ویژگی‌های حسی دوغ حاوی ترکیب عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی مانند مزه، بو، رنگ و پذیرش کلی مدنظر قرار گرفت (ISIRI, 1999).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش، به روش اندازه‌گیری مکرر در سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه روند تغییرات بین تیمارها در طول زمان در سطح احتمال 5 درصد استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل انجام شد. ارزیابی حسی نیز از طریق تکمیل پرسشنامه، براساس آزمون هدونیک 5 نقطه‌ای و در 5 حالت تعیین شد. بیشترین امتیاز (5) گزینه خیلی‌زیاد دوست داشتم و کمترین امتیاز (1) برای گزینه خیلی زیاد دوست نداشتم، در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مریم‌گلی، دارچین و ریحان و شاخص غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) ترکیب عصاره‌ها بر علیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

خاصیت ضدمیکروبی عصاره سه گیاه ریحان، دارچین، مریم‌گلی و ترکیب هر سه عصاره با تعیین مقادیر MIC و MBC مورد بررسی قرار گرفت (جدول 1).

جدول 1- حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مریم‌گلی، دارچین، ریحان و ترکیب آنها برعلیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

میکروارگانیسم بیماری‌زا	مریم‌گلی		دارچین		ریحان		ترکیب هر سه عصاره	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	1/60	3/12	12/5	12/5	12/5	12/5	0/4	0/8
ساکارومایسس سرویزیه	6/25	12/5	12/5	25/1	6/25	12/5	0/4	0/8
اشرشیاکلای	12/5	12/5	12/5	12/5	12/5	12/5	3/12	6/25

نتایج به‌دست آمده نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ریحان 6/25 و 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، عصاره دارچین 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره مریم‌گلی بین 1/60 و 12/5 میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی عصاره ریحان 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، عصاره دارچین 12/5 الی 25/1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره مریم‌گلی 3/12 الی 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی ترکیب سه عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساکارومایسس سرویزیه* به‌ترتیب 0/4 و 0/8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. MBC عصاره دارچین و ریحان برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* با میزان MIC برابر بود. MBC عصاره مریم‌گلی، دارچین و ریحان بر علیه *اشرشیاکلای* با میزان MIC برابر بود. براساس جدول 1، با توجه به حداقل بودن MIC، حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر عصاره‌های به‌کار برده شده به تنهایی بیشتر بود و با غلظت کمتری از عصاره مورد استفاده، رشد آن مهار شد (Ahmadi *et al*., 2018) درحالی که با توجه به حداکثر بودن MIC، حساسیت

اشرشیاکلای در برابر عصاره‌های به‌کار برده شده به تنهایی کمتر بود. کاربرد توام هر سه عصاره با یکدیگر بطور چشم‌گیری MIC و MBC را کاهش داد که نشان‌دهنده موثرتربودن خاصیت ضدمیکروبی آنها بر علیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در مقایسه با هر یک از عصاره‌ها به تنهایی بود.

بررسی برهمکنش‌های ضدمیکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم‌افزایی، افزایشی، عدم تأثیر و یا کاهش اثر می‌باشد. با توجه به اینکه در طب سنتی ایران گیاهان دارویی به‌صورت مخلوط نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند، یافته‌های مربوط به واکنش متقابل ترکیب عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی در فعالیت ضدمیکروبی بر اساس شاخص غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) در جدول 2 آورده شده است. تفسیر شاخص غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) به 4 حالت امکان‌پذیر است چناچه (FIC≤0/5) حالت هم‌افزایی، (0/5<FIC≤0/75) حالت افزایشی، (0/75<FIC<2) عدم تأثیر و اگر (FIC≥2) حالت کاهش اثر یا آنتاگونیسم دارند (Goni *et al.*, 2009). نتایج این پژوهش نشان داد ترکیب عصاره ریحان و دارچین و ترکیب هر سه عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی بر علیه هر سه باکتری اثر هم‌افزایی داشت. در ترکیب عصاره مریم‌گلی با ریحان و همچنین ترکیب مریم‌گلی با دارچین در برابر همه میکروارگانیسم بیماریزای مورد بررسی اثر هم‌افزایی مشاهده نشد (بی‌اثر). همچنین ترکیب سه عصاره ریحان دارچین و مریم گلی در مقابل *اشرشیاکلای* اثر هم‌افزایی ضعیف‌تری نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد. در تمام حالات ترکیب عصاره‌ها اثرات رقابت‌کنندگی مشاهده نشد.

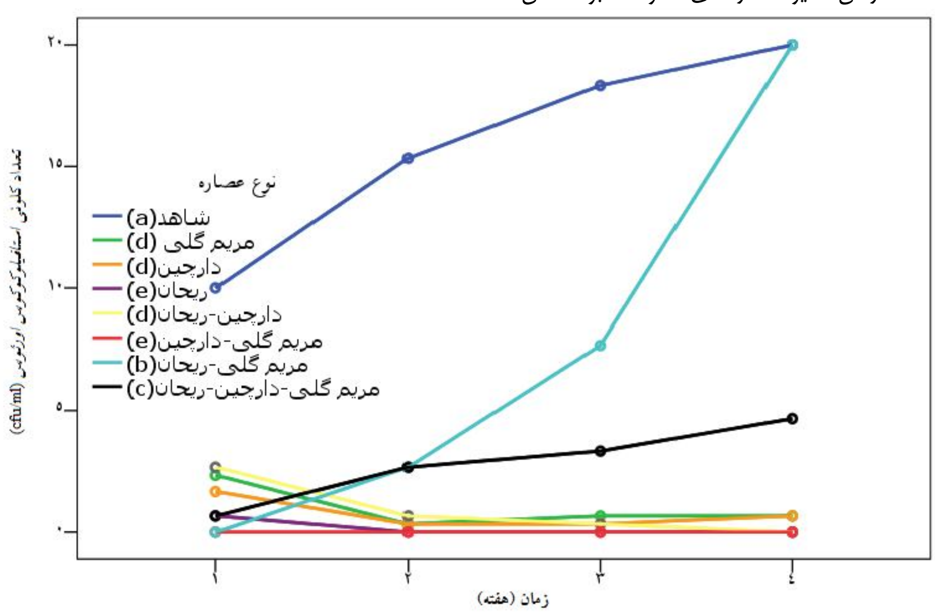
جدول 2- شاخص غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی برعلیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

میکروارگانیسم بیماری‌زا	ریحان،دارچین، مریم‌گلی
استافیلوکوکوس اورئوس	0/03
اشرشیاکلای	0/74
ساکارومایسس سرویزیه	0/16

نتایج آزمون‌های میکروبی

ارزیابی جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول دوره نگهداری

نتایج شمارش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* طی نگهداری نشان داد که با گذشت زمان تاثیر عصاره‌های ذکرشده بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش یافت (p<0/05) به‌طوری که تعداد کلونی *استافیلوکوکوس اورئوس* شاهد نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره افزایش یافت (شکل 1).



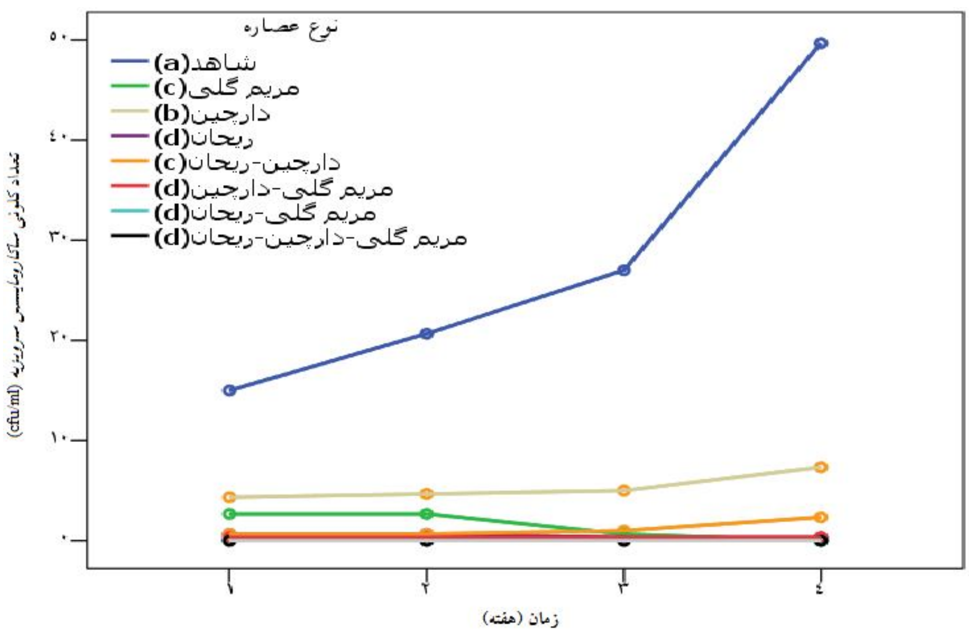
شکل 1- اثر عصاره‌های مختلف بر تغییرات جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در دوغ طی 4 هفته

حروف متفاوت در کنار نام تیمارها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<0/05) در طول نگهداری می‌باشند

همچنین نمونه دوغ حاوی عصاره مریم گلی و ریحان نیز نشان از عدم وجود خواص پایدار ضدمیکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد که نمی‌تواند علت این تفاوت فاحش باشد. سایر نمونه‌ها در طول زمان رشد میکروبی چندانی نشان ندادند که این نشان‌دهنده خواص پایدار ضدمیکروبی عصاره‌ها در دوغ می‌باشد. ترکیب این سه عصاره اثر سینرژیستی بیشتری بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* داشت ($p<0/05$). بیشترین اثر سینرژیستی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در ترکیب عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی مشاهده شد($p<0/05$). طباطبایی یزدی و همکاران (2016) اثر عصاره آویشن، نعناع و کاکوتی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* را به‌صورت تکی و ترکیبی در دوغ صنعتی بررسی کردند. آنها گزارش کردند استفاده همزمان دو عصاره آویشن و کاکوتی با غلظت مناسب موثرتر از کاربرد هر یک از عصاره‌ها به تنهایی بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. تحقیقات نشان داده است، اغلب یک ماده گیاهی به تنهایی نمی‌تواند یک فرآورده را به اندازه کافی محافظت نماید ولی در صورت انتخاب صحیح اجزاء نگهدارنده طبیعی (عصاره و یا اسانس) و ترکیب آنها با غلظت مناسب، می‌توان سیستم محافظتی خوبی در برابر میکروارگانیسم‌ها و نگهداری طولانی‌تر مواد غذایی داشت (Azizkhani *et al*., 2012). افزایش تاثیر مواد ضدمیکروبی به هنگام استفاده همزمان از دو یا چند ترکیب، ناشی از افزایش تعداد منافذ تشکیل شده در غشای سلولی عوامل بیماری‌زا و به‌دنبال آن نشت ترکیبات داخل سلولی به خارج از سلول و همچنین مهار پروتئین‌های آنزیمی مسئول حفظ ویژگی‌های عملکردی غشای سلولی می‌باشد.

ارزیابی جمعیت *ساکارومایسس سرویزیه* در طول دوره نگهداری

نتایج شمارش جمعیت *ساکارومایسس سرویزیه* طی نگهداری حاکی از تاثیر معنی‌دار همه عصاره‌ها به‌صورت تکی و همچنین به صورت ترکیبی در مقایسه با شاهد بر علیه *ساکارومایسس سرویزیه* بود($p<0/05$) (شکل 2).



شکل 2- اثر عصاره‌های مختلف بر تغییرات جمعیت *ساکارومایسس سرویزیه* در دوغ طی 4 هفته

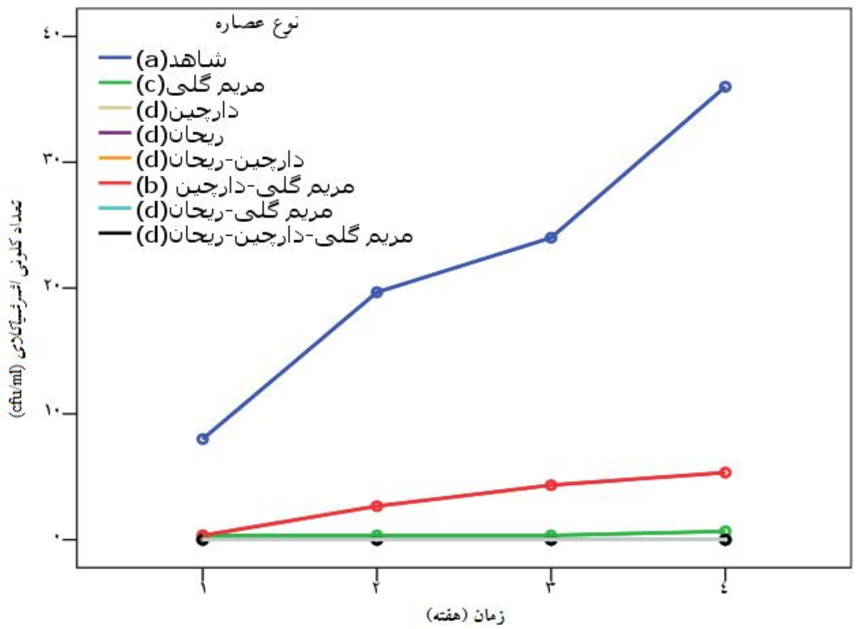
حروف متفاوت در کنار نام تیمارها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در طول نگهداری می‌باشند

هرچند که در بین عصاره‌ها نیز عصاره دارچین اثر ضعیف‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان داد ($p<0/05$). همچنین در بین کلیه تیمارهای به‌کار رفته در این پژوهش، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداکثر خاصیت هم‌افزایی بر علیه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در طی دوره نگهداری، در ترکیب هر سه عصاره ریحان- دارچین- مریم‌گلی مشاهده شد ($p<0/05$). اگرچه مطالعات صورت گرفته در زمینه اثر هم‌پوشانی و یا هم‌افزایی عصاره گیاهان دارویی در محیط‌های واقعی غذایی گسترده نمی‌باشد ولی نتایج آنها نشان داده است افزودن ترکیبات مؤثره گیاهان مختلف دارویی به یکدیگر می‌تواند در افزایش قدرت ضد باکتریایی آنها تأثیرگذار باشد

(Hassanzadeh, 2012). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج کریمی (1386) همخوانی داشت. آنها اثرات ضدمیکروبی اسانس نعناع، پونه و گلاب را بر روی *دباریومایسس هانسنی* در دوغ ایرانی، طی 28 روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاکی از تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع و پونه در کاهش جمعیت مخمر بود. اگرچه بروز فعالیت ضدباکتریایی اغلب بسیار واضح است ولی مکانیسم عمل آن به‌طور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند عصاره و اسانس گیاهان اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل عصاره و اسانس‌ها اثبات نموده است که این ترکیبات گیاهی از طریق روش‌هایی چون تجزیه دیواره سلولی، افزایش اسیدیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، آسیب به غشای پروتئین‌ها، نشت محتویات سلول به خارج و اختلال در نقل و انتقالات می‌باشد (Lino, 2010). بعضی از این ترکیبات قادر هستند با نفوذ در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها موجب دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول میکروارگانیسم شوند (Oussalah *et al*., 2006). در گیاهان مقادیر قابل توجهی متابولیت‌های ثانویه شامل ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، ترپن‌ها در بافت‌های مختلف آنها ذخیره می‌باشد که برای بروز خاصیت ضدباکتریایی آنها بسیار مهم است (Swamy *et al*., 2016; Marino *et al*., 2001).

ارزیابی جمعیت *اشرشیاکلای* در طول دوره نگهداری

مطابق استاندارد ملی ایران به شماره 2453 میزان کلی‌فرم در هر میلی‌لیتر دوغ باید صفر باشد (ISIRI, 2007). نتایج شمارش جمعیت *اشرشیاکلای* طی نگهداری حاکی از تاثیر مناسب اغلب عصاره‌ها در جلوگیری از رشد *اشرشیاکلای* در محیط دوغ در مقایسه با نمونه شاهد بود ($p<0/05$) (شکل 3).



شکل 3- اثر عصاره‌های مختلف بر تغییرات جمعیت *اشرشیاکلای* در دوغ طی 4 هفته

حروف متفاوت در کنار نام تیمارها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$)در طول نگهداری می‌باشند

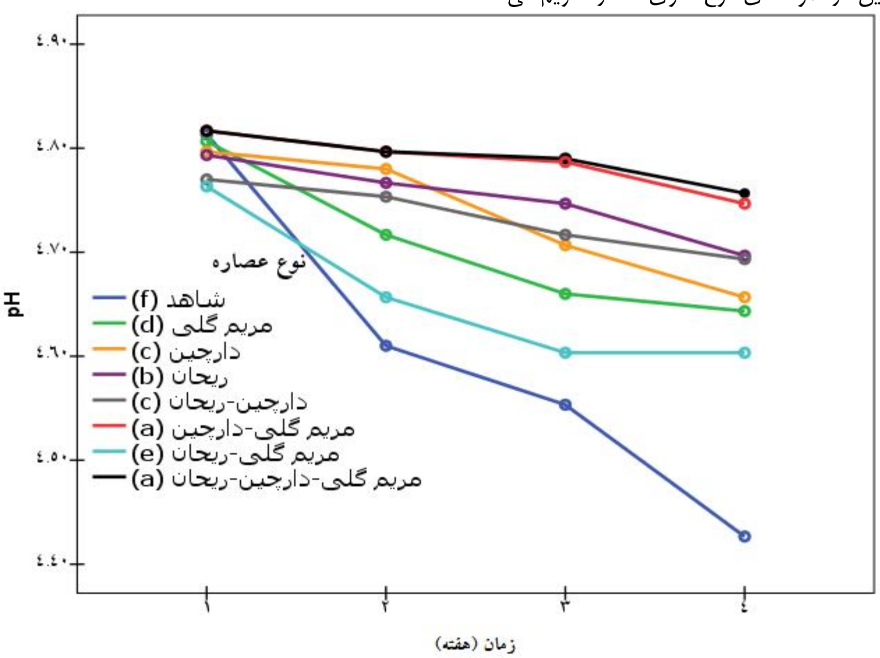
از میان میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مورد بررسی، باکتری گرم منفی *اشرشیاکلای* مقاوم‌تر از سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بود. نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر خاصیت ضدمیکروبی عصار و اسانس‌های گیاهی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است که می‌تواند به دلیل وجود غشاءهای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در آنها باشد. غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها با این فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا به‌صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا این که به‌صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (Sandri *et al*., 2007). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ترکیب سه عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی

و پس از آن ترکیب عصاره‌های مریم‌گلی و ریحان و همچنین ریحان و دارچین بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را در کاهش جمعیت *اشرشیاکلای* در طی دوره نگهداری از خود نشان دادند ($p<0/05$). اما ترکیب عصاره‌های مریم‌گلی و دارچین اثر ضعیف‌تری در جلوگیری از رشد *اشرشیاکلای* نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان داد ($p<0/05$). نتایج این پژوهش با مطالعه Oroojalian و همکاران (2010) هم‌خوانی داشت. آنها گزارش گردند استفاده ترکیبی عصاره ریحان، دارچین و مریم‌گلی علیه اغلب میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا خاصیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به کاربرد انفرادی هر عصاره به تنهایی دارد.

نتایج آزمون‌های شیمیایی

روند تغییرات pH در طول دوره نگهداری

در فرآورده‌های غذایی تخمیری از جمله لبنیات، اسیدیته بالا و pH پایین، مهم‌ترین عوامل کاهش قابلیت زیستی باکتری‌های مفید می‌باشند (Dinakar & Mistry, 1994). با توجه به شکل 4، pH نمونه‌های دوغ با گذشت زمان در طول دوره نگهداری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$) این در حالی است که افزودن عصاره از کاهش pH در طول زمان به‌طور معنی‌داری جلوگیری کرد ($p<0/05$) به‌طوری که نمونه شاهد بیشترین و نمونه حاوی ترکیب هر سه عصاره کمترین تغییرات pH را در طول زمان از خود نشان دادند ($p<0/05$). همچنین در نمونه‌های دوغ حاوی عصاره مریم‌گلی و ترکیب عصاره‌های مریم‌گلی و ریحان بیشترین تغییرات کاهشی pH در مقایسه با سایر تیمارهای حاوی عصاره مشاهده شد ($p<0/05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تولید اسید توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* در نمونه‌های حاوی ترکیب عصاره در طول دوره نگهداری در محیط بیشتر از نمونه شاهد بوده است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج مرتضویان و همکاران (2007) و وثوق و همکاران (2009) مطابقت داشت. علت کاهش pH احتمالا شکسته شدن برخی از گروه‌های استری و تبدیل آنها به گروه اسیدی است. از سوی دیگر رشد باکتری‌های مقاوم به اسید همچون *لاکتوباسیلوس‌ها* نیز ممکن است در این زمینه موثر باشند. مرتضویان و همکاران (2007) نیز علت کاهش pH را باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* که عامل اسیدسازی یا بیش‌اسیدسازی در ماست است معرفی کردند. این باکتری در محصول دوغ نیز به همان صورت عمل می‌کند به طوری که برخلاف *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* که در pH کمتر از 4/5 فعالیتش متوقف می‌شود حتی تا pH پایین‌تر از این مقدار (3/5-3) می‌تواند تولید اسید را ادامه دهد. در دوغ نیز این باکتری حتی قادر به کاهش pH به کمتر از 3/8 است. به‌طور کلی می‌توان گفت که در زمان تخمیر و نگهداری، روند کاهش اسیدیته در محصول حتی تا pH<3/5 ادامه خواهد یافت و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* قادر به بیش‌اسیدسازی در محصول دوغ نیز همچون ماست است (Dini *et al*., 2013).

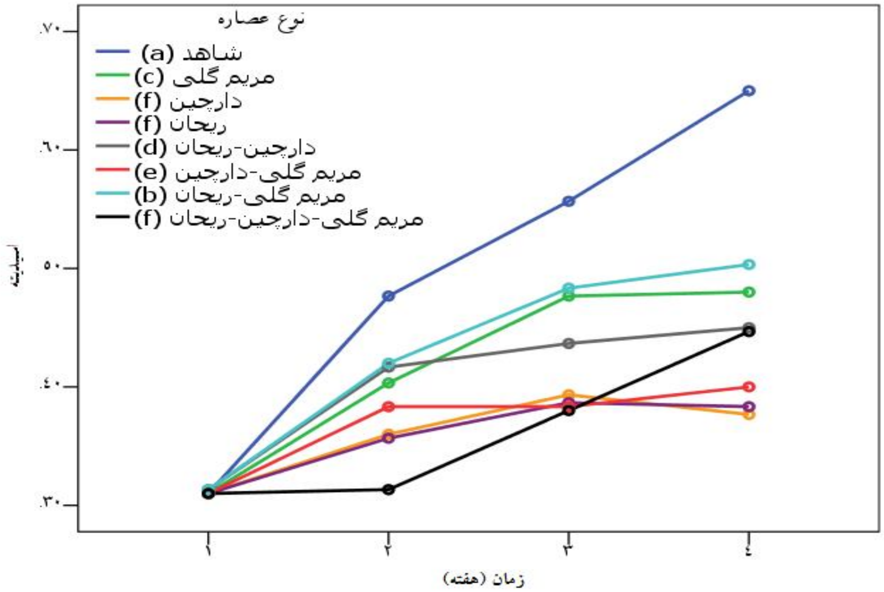


شکل 4- اثر عصاره‌های مختلف بر تغییرات pH دوغ طی 4 هفته

حروف متفاوت در کنار نام تیمارها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$)در طول نگهداری می‌باشند

روند تغییرات اسیدیته در طول دوره نگهداری

با توجه به شکل 5، اسیدیته نمونه‌های دوغ با گذشت زمان در طول دوره نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<0/05) این در حالی است که افزودن عصاره از افزایش اسیدیته در طول زمان به‌طور معنی‌داری جلوگیری کرد (p<0/05) به‌طوری که نمونه شاهد بیشترین و نمونه حاوی عصاره دارچین، ریحان و همچنین نمونه حاوی ترکیب سه عصاره کمترین تغییرات اسیدیته را در طول زمان از خود نشان دادند (p<0/05).



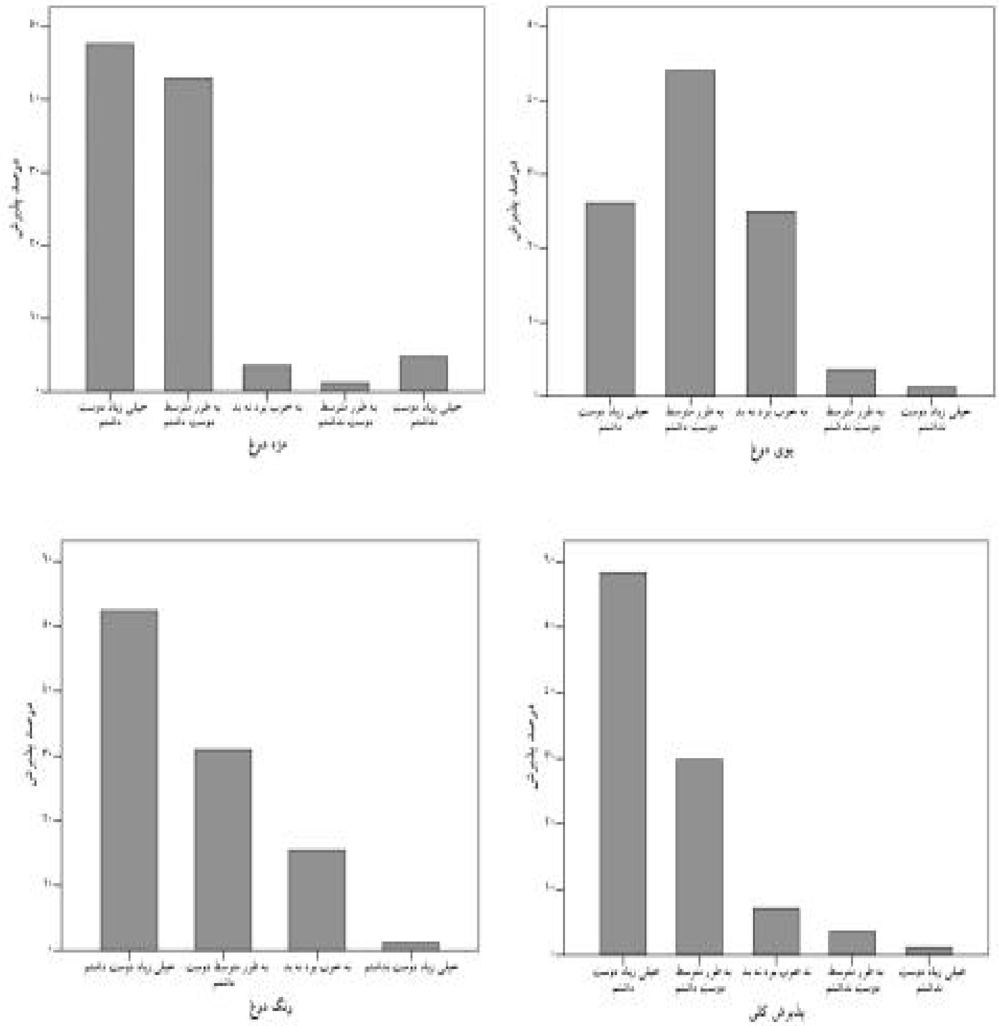
شکل 5- اثر عصاره‌های مختلف بر تغییرات اسیدیته دوغ طی 4 هفته

حروف متفاوت در کنار نام تیمارها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<0/05) در طول نگهداری می‌باشند

همچنین در نمونه‌های دوغ حاوی عصاره مریم‌گلی و ترکیب عصاره‌های مریم‌گلی و ریحان بیشترین اسیدیته در مقایسه با سایر تیمارهای حاوی عصاره مشاهده شد (p<0/05). به‌طوری که در نمونه‌های حاوی ترکیب عصاره‌های دارچین و ریحان و همچنین مریم‌گلی و ریحان افزایش اسیدیته در هفته دوم بیشتر مشهود بود که با نتایج Sendra و همکاران (2008) و Zareali و همکاران (2015) مطابقت داشت. Sendra و همکاران (2008) گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی سبب تحریک بیشتر رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* می‌شود و در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی این باکتری و رهاسازی اسیدهای آمینه آزاد، اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش می‌یابد.

ارزیابی ویژگی‌های حسی

خواص حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیاری از فرآورده‌ها و کسب رضایت از مصرف آنها است. با توجه به اهمیت این خواص بررسی و شناخت عوامل موثر بر آنها به‌منظور دستیابی به خواص بهینه و جلوگیری از ایجاد خواص حسی نامطلوب ضروری است. طعم یکی از مهم‌ترین جنبه‌های کیفی غذاها و نوشیدنی‌ها است که پذیرش مصرف کننده را در پی خواهد داشت. مهم‌ترین عوامل موثر در طعم محصولات لبنی مقادیر استالدئید و دی‌استیل هستند که در اثر تخمیر محصولات لبنی ایجاد می‌شوند (Roberfrod, 1996). شکل 6 نتایج مقایسه میانگین آزمون ارزیابی‌حسی نمونه دوغ حاوی ترکیب عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی را نشان می‌دهد. با توجه به این که ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه حاوی ترکیب سه عصاره فوق‌الذکر صرفا به‌منظور مطالعه پذیرش آن انجام شده است بنابراین بررسی درصد پراکندگی نشان داد که 47/6 درصد افراد مزه دوغ را خیلی زیاد دوست داشتند. در حالی که 26/2، 52/4 و 58/3 درصد افراد مورد بررسی به‌ترتیب بو، رنگ و پذیرش کلی نمونه حاوی ترکیب سه عصاره را خیلی زیاد دوست داشتند. میانگین نظرهای جمع‌آوری شده نشان داد که نمونه دوغ حاوی ترکیب سه عصاره فوق‌الذکر از نظر مزه، بو، رنگ و پذیرش کلی دوغ قایل قبول تشخیص داد شد به طوری که حدود90 درصد شرکت کنندگان حاضر به مصرف آن بودند. لازم به ذکر است که نوع تیمار و غلظت استفاده شده در فرمولاسیون نمونه دوغ نقش مهمی بر پذیرش نمونه‌ها از نظر عطر و طعم و سایر ویژگی‌های حسی توسط مصرف‌کننده دارد.



شکل 6- ارزیابی حسی دوغ حاوی ترکیب عصاره‌های ریحان، دارچین و مریم‌گلی

نتیجه‌گیری

نظر به اهمیت تغذیه‌ای و اثرات سلامتی‌بخش و همچنین خواص ضدمیکروبی گیاه ریحان، دارچین و مریم‌گلی و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به فرآورده‌های طبیعی و اجتناب از نگهدارنده‌های مصنوعی، ضرورت مطالعه و گسترش در این حوزه امری بدیهی می‌نماید. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، ترکیب عصاره‌های هیدروالکلی سه گیاه ریحان، دارچین و مریم‌گلی بر روی سویه‌های غذایی *اشرشیاکلای، استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر ساکارومایسس سرویزیه* در محیط دوغ خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی از خود نشان داد. همچنین با استفاده از غلظت مناسب عصاره‌های هر سه گیاه و ایجاد خاصیت هم‌افزایی ناشی از ترکیب آنها هم می‌توان خواص حسی دوغ را در طی نگهداری حفظ کرده و جمعیت میکروبی آن را کاهش و زمان ماندگاری آن را بهبود بخشید. کاربرد همزمان این عصاره‌ها دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی به‌ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت بود و می‌توان در راستای بهینه‌سازی استفاده از عصاره‌ها در کنترل مؤثر بیماریزاهای مواد غذایی به‌عنوان یک روش مکمل که در عین حال اثر نامطلوب کمتری بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی داشته باشند، در دوغ استفاده شود. برای دست یافتن به نتایج بهتر لازم است اثر عصاره آبی و نیز اسانس این گیاهان در غلظت‌های متفاوت با نتایج پژوهش حاضر مقایسه شود. همچنین پیشنهاد می‌شود برای آزمون حسی از غلظت‌های متفاوت عصاره نیز برای مقایسه استفاده گردد.

منابع

Ahmadi, S.M., Moslehishad, M., Rahimi, A. 2018. Evaluation of antimicrobial activity of oleoresin essential oil of Pistacia atlantica on *Staphlicoccus aureus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces matxianus, Penicillum natatum* and its impact on Iranian doogh shelf life. *JFST*. 85(15):113-124 [In Persian].

Azizkhani, M., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi Nasrabadi, H., Hosseini, H. 2012. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential Oil on Growth and Enterotoxin E Production of *Staphylocuccus aureus* ATCC 29213. *J Med plants*. 11(44): 185-192 [In Persian].

Abolhosseini, Sh., Golestan, L., Kaboosi, H. 2019. The effect of fresh and ripe Pistacia atlantica on Shelf life and sensory properties of Iranian doogh. *JFST*. 85(15):417-424 [In Persian].

Baron, E.J., and Finegold, S.M. 1990. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th Ed., CV Mosby Co., St. Louis, USA .pp: 286-402, 435-438.

Behradmanesh, S., Derees, F., Rafieian-kopaei, M. 2013. Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. *J Renal Inj Prev*. 2(2): 51-54.

Celiktas, O.Y., Kocabas, E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., and Baser, K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 14:323-8.

Dinakar, P., and Mistry, V. 1994. Growth and viability of *Bifidobact erium bifidum* in cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 77: 2854-2864.

Dini, A., Razavi, S.H., and Ebrahimzadeh Mousavi, S.A. 2013. Effect of incubation and storage temperatures and final pH on the viability of probiotic bacteria and sensory characteristics in probiotic Doogh. *J. Food Sci.* 23(3):367-380 [In Persian].

Farajvand, N., Alimohammadi, M. 1393. Prevalence of Staphylococcus aureus in Four Famous Brand of Doogh Produced in Iran. *Iran. J. Health & Environ.* 7 (1):85-94.

Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Go.mez-Lus, R., Becerril, R., and Nerin, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116:982-989.

Heinrich, M., Barne, J., Gibbons, S., Williamson, M. 2012. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. *Elsevier* Ltd, p. 232.

Hassanzadeh, A. 2012. Cinnamon and its properties. *Monthly Training and New Technology Research of Food.* Haghjoo R., and Tadjalli M. 2016. Effect of Persian Sage (*Salvia rhytidia*) Extract on Histomorphometric Changes of Cerebral Cortex and Hippocampus Following Ischemia-Reperfusion Injuries in Rat. *Zahedan J Res Med Sci*. 18(2):59-93.

ISIRI. 2007. Doogh – Specifications and test method. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2453, 1th ed. Tehran.

ISIRI. 2007. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products–Enumeration of colony forming units of yeasts and/or moulds-colony-Count technique at 25°C, No. 10154. 1st. Ed Tehran.

ISIRI. 1999. Basic principles of sensory evaluation of milk and its products. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, No. 4691.

Kermanshah, H., HashemiKamangar, S., Arami, S., Mirsalehian, A., Kamalinejad, M., Karimi, M., JabalAmoli, F. 2009. In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinellaanisum* against cariogenic bacteria. *JIDA*. 22:149-54.

Karimi, A. 1386. Study the antimicrobial effect of essential oils of mint, oregano, rose water and effect of the temperature on the growth of *Debaryomyces hansenii* in Doogh. Ph.D. thesis in food hygiene. *IAU*. Oloum tahghighat branch.

Lino, C.M., and Pen, A. 2010. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chem.* 121(2):503-508.

Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S., and Reihemer, J. A. 2007. MRS-Bile agar: Its suitability for the enumeration of mixed probiotic in cultured dairy products. *Milchwissenschaft*. 62:270–272.

Marino, M., Bersani, C., and Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbial.* 67(3):187-195.

Mehraban, A., Edalatian Dovom, M. R., Haddad Khodaparast, M.H., Mehraban Sang Atash, M. 2017. Study of antibacterial effect of aqueous, ethanolic and droalcoholic extracts of aerial oranges of *Salvia chorassanica* against some spoilage and poisoning bacteria. *JFST*. 66(14):215-225 [In Persian].

NCCLS. 2000. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M7-A5.

Nourizadeh, E., Ghasemi, K., Latifi, S. 2003. Anti-bacterial effects of Licorice on *Helicobacter Pylori* .The 3th National Congress of Biotechnology. 9-11. Mashad, Iran.

Oussalah, M., Caillet, S., and Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of *Spanish oregano*, *Chinese cinnamon*, and *savory* oils against cell membrane and walls of *Escherichia coli O157:H7* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot*. 69(5):1046-1055.

Oroojalian, F., Kasra kermanshahi, R., Azizi, M., Basaami, M.R. 2010. Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. *IJMAP*. 26 (2):133-146 [In Persian].

Shirazi, M.H., Ranjbar, R., Eshraghi, S., Amin, G., Seyed Nouri, M., and Bazzaz, N. 2008. Inhibitory Effects of Sage Extract on the Growth of Enteric Bacteria. *PJBS*. 11:487-489.

Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P.L., Echeverrigaray, S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species ofthe genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chem.* 103:823–828.

Sendra, E., Fayos, F., Lario, Y., Ferna’ndez-Lo’pez, J., Sayas-Barbera’, E. and Pe’rez Alvarez, J.A. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food microbiol*. 25:13-21.

Sajjadi, SE. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L) from Iran. 2006. *Daru J. Pharm. Sci*. 14(3):128 - 130.

Swamy, M.K., Akhtar, M.S. and Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid-Based. Compl. Alt.* p: 1-20.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds.

Tamime, A. and Robinson, R. 1999. Yogurt Science and Technology. Woodhead Publ. Cambridge, England, and CRC Press, Boca Raton, FL.

Tabatabaie yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., and Mortazavi, S. A. 2016. Investigation Effects of Lamiaceae plants (*Thymus vulgaris* L., *Mentha spp*. and *Ziziphora tenuir* L.) Inhibitory *Staphylococcus aureus* and *Geotrichum candidium* in Razavi Khorasan Province Industrial Doogh Samples with Response Surface Method (RSM). *IJSTS*. 51(13):15-28 [In Persian].

Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Caillag, l., Sevastre, B. 2014. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedry* S. *Molecules*. 19:5940-5507.

Voosogh, A.S., Khomeiri, M., Kashani Nijad, M., Jafari, S.M., 2009. Effects of mint extract on the viability of probiotic bacteria in a native Iranian dairy drink (Doogh). *ANRES*. 16(1):156-164. [In Persian].

Roberfroid, MB. 1996. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev*. 54(11):38-42.

Zareali, M., Hojjati, M., Tahmozi didehban, S., Jouyandeh, H. 2015. Effect of echinophora (*Echinophora cinerea Boiss*) and Stachys (*Stachys lavandulifolia Vahl*) extracts on qualitative and sensory charactristics of Doogh. *IJBSE*. 46(3):327-337 [In Persian].

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 43- 56

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1، فروردین -اردیبهشت 1399 ص. 56-43

Interaction of antimicrobial properties of hydro-alcoholic extracts of Basil (*Ocimum basilicum)*, *Salvia* (*Salvia officinalis)* and Cinnamon in Iranian yoghurt drink (doogh)

H. Shahsavar [1], M. Bolandi[*2], H. Baghaei[3]

Received: 2019.04.19
Accepted: 2019.06.02

Introduction: Plant extracts have antimicrobial properties and can be substituted as chemical flavorings in food. Preservatives are compounds that are used to inhibit the growth or to eliminate harmful microorganisms to increase the shelf life of foods. Nowadays, the use of natural preservatives derived from medicinal plants is increasing due to their greater compatibility and the presence of volatile compounds (Celiktas et al., 2007). The antimicrobial properties, antioxidant and anticancer effects of these natural additives have been proven (Tajkarimi et al., 2010). In this study, the antimicrobial activity enhancement effect of the combination of hydroalcoholic extracts of basil, cinnamon and salvia on Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Saccharomyces cerevisiae yeast in Iranian yoghurt drink (doogh) was investigated for 4 weeks at ambient temperature.

Materials and Methods: The milk was boiled in hygienic conditions at 95 ° C for 5 min. After cooling to 45 ° C, they were inoculated. The aerial parts of the studied plants were milled and powdered. Cinnamon, basil and salvia extracts were then soaked. The food strains of Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 700728 and Saccharomyces cerevisiae PTCC 5193 were prepared as lyophilized ampoules. The microdilution broth method was used to determine the minimum inhibitory concentration. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined in accordance with the minimum inhibitory concentration (MIC) results. To determine the antimicrobial effect of the extracts on the yoghurt drink, 9 ml of the prepared yoghurt drink was poured into each test tube. Then 1 cc of each extract and 1 cc of microbial suspension (1.5 × 108 CFU / ml) were added. One tube was considered as positive control (bacteria + yoghurt drink), one negative control tube (extract + yoghurt drink) and one control tube (yoghurt drink only) and the tubes were placed at ambient temperature. Then, on day 7, 14, 21 and 30 during storage, 20 µl of each tube, were cultured on Muller Hinton agar medium and the same amount of yeast was cultured on blood agar medium. After incubation for 24 h at 37 ° C, the colonies were counted. The interaction of antimicrobial activity of the combination of basil, cinnamon and sage extracts was evaluated on the basis of differential inhibitory concentration index (FIC).

Results and discussion: The results showed that the minimum inhibitory concentration of the combined basil, cinnamon and sage extracts against Staphylococcus aureus and Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli were 0.4, 0.4 and 3.12 mg / ml, respectively. Also, Staphylococcus aureus was more susceptible to the extracts, which were used alone, and was inhibited by a lower concentration of used extract (Ahmadi et al., 2018). However, due to the maximum minimum inhibitory concentration (MIC), Escherichia coli was less sensitive to the extracts which was used alone. The combined usage of all three extracts significantly reduced the maximum minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC), indicating that their antimicrobial activity was more effective against the studied microorganisms than each of the extracts which was used alone. The results of this study showed that synergistic effect against Staphylococcus aureus and Saccharomyces cerevisiae was more effective with the combination of the aforementioned extracts ($p < 0.05$). The results of the Escherichia coli population counting during storage indicated that most of the extracts had a good effect on preventing the growth of Escherichia coli in the doogh environment compared to the control sample ($p < 0.05$). Addition of the extract significantly prevented pH reduction over time ($p < 0.05$), so that the control sample had the highest and the sample containing all three extracts showed the lowest pH changes over time ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that acid production by Lactobacillus bacteria in samples containing extract during storage period was higher than control. The results of this study were in agreement with the results of Mortazavian et al., (2007) and Voosogh et al., (2009). The acidity of the doogh samples increased significantly over time ($P < 0.05$), while the addition of the extract significantly prevented the acidity increase over time

1, 2 and 3. Former MSc student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.ad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
(*- Corresponding Author Email: M.Bolandi@Damghaniau.ac.ir)

(P<0.05). Sensory properties are the main factors of acceptance and satisfaction of many products. In this study, the mean viewpoint of doogh samples containing the combination of the three above mentioned extracts in terms of taste, odor, color and general acceptance are acceptable. Additionally, it was found that about 90% of participants were willing to use it. Although studies of the overlapping or synergistic effects of medicinal plant extracts in real food environments are not extensive, their results have shown that, the addition of different medicinal plants compounds can increase antibacterial effects. Therefore, the simultaneous use of these extracts can be used in effective control of food pathogens as a complementary method. The results of this study were in agreement with the results of Karimi (2007).

Keywords: Antimicrobial effect of cinnamon, Basil, Salvia, Synergistic effects